

平成13年度

# 若手研究者奨励研究報告書

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

## 白血球機能制御を目的とするアンチセンス医薬品の開発と有効性評価に関する研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部  
研究者 安 達 玲 子

### 要 旨

白血球機能制御を目的としてアクチン調節因子コフィリンのアンチセンスオリゴDNAを作成した。白血球による活性酸素産生及び貪食反応のアッセイ系を構築し、コフィリンアンチセンスの効果を検討したところ、両反応とも増大しており、このアンチセンスが白血球機能を促進させることが示された。

### 1. 研究目的

白血球は、本来は異物の排除という生体防御反応に寄与している細胞であり、体内に侵入した病原体に対して活性酸素や種々の酵素を放出し殺菌を行うという重要な役割を果たしている。一方、白血球の機能制御系の破綻や細胞外からの異常な刺激により、障害性因子が不必要に産生・放出された場合には、自己の組織に障害を与えることになる。実際に、様々な炎症性疾患や虚血再灌流時の組織障害に白血球（好中球）が関与していることが知られている。従って、白血球の過度な機能発現を抑制することにより、このような生体に対する障害を軽減できると考えられる。

アンチセンスオリゴDNA法は、特定のタンパク質のmRNAに対するオリゴDNAを細胞に導入することにより、その発現を阻害する方法である。タンパク質の機能解析等基礎研究の一手法として多く用いられている他、現在欧米では約30種類のアンチセンス医薬品の臨床試験が実施されている。実際1998年には初のアンチセンスオリゴDNA医薬品が認可・発売された。日本国内でも、大学病院において臨床応用が始まろうとしている状況である。

白血球の機能制御に対しても、アンチセンスオリゴDNA法は有効な手段となり得る。白血球のそれぞれの機能発現にはそれぞれ特定のタンパク質が関与している。また、情報伝達系や転写因子、細胞骨格系のタンパク質の中には、諸機能の全体的なコントロールに関与するものもある。従って、これらのタンパク質に対するアンチセンスオリゴDNAにより白血球の機能を低下あるいは亢進させることは可能である。

本研究は、白血球の機能制御を目的としたアンチセンスオリゴDNAの開発、及びオリゴDNAの効果 を正しく評価するための白血球機能のアッセイ系についての研究を行うものである。

### 2. 研究方法

#### (1) アンチセンスオリゴDNAの作成

細胞骨格系因子として、アクチンフィラメント（F-アクチン）調節因子であるコフィリンに対するアンチセンスオリゴDNAの作成を行った。まず、コフィリンmRNA中の10カ所の標的配列に対するアンチセンスオリゴDNAを合成した。オリゴDNAのタイプは、アンチセンスとして最も頻繁に用いられているホスホロチオエート修飾型、いわゆるSオリゴとした。次に、48穴マイクロプレート上で、マウスマクロファージ由来培養細胞J774.1（ $1.5 \times 10^4$  cells / 300 $\mu$ l 10%FCS含有RPMI1640）に、オリゴDNAを単独で、あるいは少量の遺伝子導入試薬とともに数日間投与した。その後、ウェスタンブロッティングによりコフィリンタンパク量減少の度合いを検討して、アンチセンス活性のスクリーニングを行った。コントロールオリゴとしては、センス配列及びミスマッチ配列（アンチセンス配列中の数塩基を別の塩基に置換した配列）のオリゴDNAを用いた。

#### (2) 白血球機能アッセイ系の構築

白血球刺激時の活性酸素産生は化学発光を用いて測定した。96穴マイクロプレートで3日間培養したJ774.1細胞（約 $4 \times 10^4$  cells）をHBSSバッファーで洗浄後、活性酸素（スーパーオキシド）特異的

検出試薬であるDiogenes存在下で刺激剤オプソニン化ザイモザンを添加し、産生される活性酸素とDiogenesが反応して生じる化学発光を検出・定量した。

異物の食食反応は、蛍光染色を利用して測定した。8ウェルチャンパー付きスライドグラス上で3日間培養したJ774.1細胞（約 $5 \times 10^4$  cells）を、HBSSバッファーで洗浄後、フルオレッセイン標識オプソニン化ザイモザンで刺激した後、ホルムアルデヒドで固定し、細胞内のアクチンをCy3標識抗アクチン抗体で染色した。これを共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡で観察し、OZの緑色と染色されたアクチンの赤色が重なって黄色に見えるものを食食されたザイモザン粒子としてとらえ、明視野像と合わせて、ザイモザン粒子を食食した細胞をカウントした。

### 3. 研究成果

#### (1) コフィリンに対するアンチセンスオリゴDNAの作成

コフィリンは、F-アクチン調節因子の一つであり、脱リン酸化状態でアクチンに結合して、F-アクチンの切断・脱重合を起こす。自然界に広く分布し、様々な生物種間でアミノ酸配列がよく保存されていることから、生体にとって重要なタンパク質であると考えられる。多くの細胞において、外部からの細胞刺激に応じてコフィリンがリン酸化あるいは脱リン酸化されることが報告されている。これまで筆者らは、ヒト白血球系培養細胞HL-60において、刺激に応じてコフィリンが脱リン酸化されることを見出し、コフィリンが白血球の細胞応答に深く関与していることを示してきた。マウスマクロファージ由来培養細胞J774.1においても、刺激に応じてコフィリンがリン酸化されることを明らかにした。そこで、白血球の細胞応答において重要な細胞骨格系因子としてコフィリンをとりあげ、コフィリンに対するアンチセンスオリゴDNAのスクリーニングを行った。

アンチセンスの標的配列の候補として、コフィリンmRNA中、翻訳開始領域を含むもの・含まないもの合わせて10箇所（20~24mer）を選択した（アンチセンスオリゴDNAの作用機構として、mRNAの翻訳開始コドンを含む領域に相補的なオリゴDNAは、リボソームのmRNAへの結合・塩基配列からアミノ酸への翻訳を阻害すると考えられており、翻訳開始コドン周辺はアンチセンスの標的としてしばしば用いられている）。オリゴDNAの投与時の濃度、遺伝子導入試薬の有無や試薬の種類、細胞への投与回数、投与日数などを合わせて検討した結果、翻訳開始コドンより4塩基上流から20merのSオリゴ1~2 $\mu$ Mを、少量の遺伝子導入試薬FuGENE6とともに、1日1回、計3日間投与することにより、コフィリンタンパク量を、未処理の細胞の10~30%程度にまで減少させることができた。この時、コントロールオリゴであるセンス配列及びミスマッチ配列の投与も同時に行ったが、これらのオリゴでは、アンチセンス効果は見られなかった。

#### (2) 活性酸素産生のアッセイ系構築

好中球やマクロファージ等の食細胞は、細胞外からの刺激に応じて活性酸素を産生する。これは、生体に侵入した細菌を食細胞が殺菌する上で重要な細胞機能である。筆者はこの活性酸素産生反応を化学発光法により検出する系を構築した。細胞刺激剤としては、オプソニン化ザイモザンを用いた。オプソニン化ザイモザンは、不溶性多糖微粒子であるザイモザンを、血清で処理することにより、その表面に補体成分C3biをコーティングしたものである。これは、生体内に侵入した異物に抗体や補体が結合して食食されやすくなった状態、すなわちオプソニン化された異物を模したものとして、実験系で食細胞による異物認識から食食反応までを再現できる細胞刺激剤である。この刺激剤で食細胞を刺激すると、細胞表面のC3bi受容体（ $\beta$ 2インテグリンの一種Mac-1;CD11b/CD18）から細胞内にシグナルが入り、活性酸素が産生される。

96穴マイクロプレートで培養したJ774.1細胞を、Diogenes存在下オプソニン化ザイモザンで刺激し、産生された活性酸素由来の化学発光を、マイクロプレート対応型発光検出装置で検出した。その結果、再現性よく活性酸素の産生を測定することができた。

#### (3) 食食反応のアッセイ系構築

オプソニン化ザイモザンは、FMLP等の水溶性の細胞刺激剤と異なり、食細胞による食食反応を実験系で再現することができる。そこで、フルオレッセインで蛍光標識したオプソニン化ザイモザンを用いて食食反応の観察を行った。オプソニン化ザイモザン添加後の細胞はホルマリン固定し細胞全体を蛍光で可視化するため、細胞内のアクチンをCy3標識抗アクチン抗体で蛍光染色した。この染色

により、貪食され細胞内に取り込まれたザイモザン粒子は、フルオレッセインの緑色と染色されたアクチンの赤色が重なって黄色に観察され、一方貪食されていないザイモザン粒子は緑色のままで観察される。この蛍光像を、明視野観察での細胞像と重ね合わせ、ザイモザンを貪食した細胞と貪食していない細胞に分けてカウントした。一視野での細胞数は50個程度とし、1サンプル当たり10視野観察した。その結果、全細胞中の貪食した細胞の割合を再現性よく算出することができた。

#### (4)食細胞機能に対するコフィリンアンチセンスの効果

上記(2)、(3)のようにして構築した2種類の細胞機能アッセイ系を用いて、コフィリンに対するアンチセンスオリゴDNAの効果を検討した。96穴マイクロプレートあるいは8ウェルチャンパー付きスライドグラス上で3日間J774.1細胞を培養し、その間1日1回アンチセンスオリゴDNAを投与した。最終投与の翌日、細胞をオプソニン化ザイモザンで刺激し、活性酸素産生及び貪食反応を検討した。その結果、アンチセンスによりコフィリンタンパク量を減少させた細胞では、対照細胞（未処理細胞、コントロールオリゴDNA投与細胞）と比較して、活性酸素産生は2-3倍に（図1）、貪食した細胞の割合は約1.4倍（図2）に増大することが示された。

## 4. 考 察

### (1)コフィリンアンチセンスオリゴDNAについて

先に述べたように、アンチセンスオリゴDNAの標的配列としては、mRNA上の翻訳開始コドンを含む領域がよく使われているが、その他に、アミノ酸コーディングシークエンス内の他の部分、あるいはコーディングシークエンスの3'下流域内の部分が標的として有効である場合もある。アンチセンスのメカニズムはリボソームの結合を阻害すること以外にも数通り考えられており、mRNAの立体構造の破壊による安定性の低下等も関与しているようである。しかし、コフィリンの場合には、結果として翻訳開始コドンを含む領域が標的として有効であった。但し、細胞骨格系因子であるコフィリンは、細胞内での量が比較的多いタンパク質であり、アンチセンス投与後のタンパク量は最低で対照細胞の10%程度と、コフィリンタンパクの発現を完全に阻害することはできなかった。コフィリン量の減少は細胞にとっては負の要因となるらしく、投与するオリゴDNA量をこれ以上増加させると細胞数が大幅に減少してしまい、機能のアッセイが行えなかったため、オリゴDNAの投与量を増すことはしなかった。

### (2)細胞機能のアッセイ系について

活性酸素の産生については、比色法や蛍光法と比較してより感度のよい化学発光法を利用することにより、96穴マイクロプレートを用いて、1ウェル当たり $4 \times 10^4$ 程度の比較的少ない細胞数で、測定することが可能であった。

貪食反応については、今回用いたアッセイ法と同様に蛍光標識したオプソニン化ザイモザンを用いて、貪食によりザイモザン粒子を取り込んだ細胞を（付着性細胞の場合は剥離させて懸濁液としてから）フローサイトメーターで検出するという手法がある。しかし、筆者が使用したJ774.1細胞は、非常に付着性が強い細胞であるため、ザイモザン粒子を標識した蛍光と、細胞側（この場合はアクチン）を染色した異なる蛍光との重なりを蛍光顕微鏡で観察することにより、貪食されたザイモザン粒子を検出するという手法を取った。この方法によって貪食した細胞をカウントすることは十分可能であった。

### (3)コフィリンアンチセンスの効果について

筆者らこれまで、培養食細胞において、F-アクチン調節因子であるコフィリンと食細胞機能とが密接に関連していることを示してきた。J774.1細胞においても、オプソニン化ザイモザン刺激によりコフィリンがリン酸化される（すなわちF-アクチンの脱重合・切断活性を失う）こと、貪食や活性酸素産生のある細胞膜の近傍でF-アクチンが増大することを明らかにした。そこで、コフィリンと食細胞機能との関係を解明し、細胞骨格系から食細胞機能制御へアプローチする方法の一つとして、コフィリンに対するアンチセンスオリゴDNAが食細胞機能に及ぼす影響について検討した。その結果、コフィリンアンチセンス処理により、活性酸素産生・貪食反応とも対照細胞より増大することが示された。

コフィリンはリン酸化されるとアクチン分子に結合できなくなり、F-アクチンの脱重合・切断活性

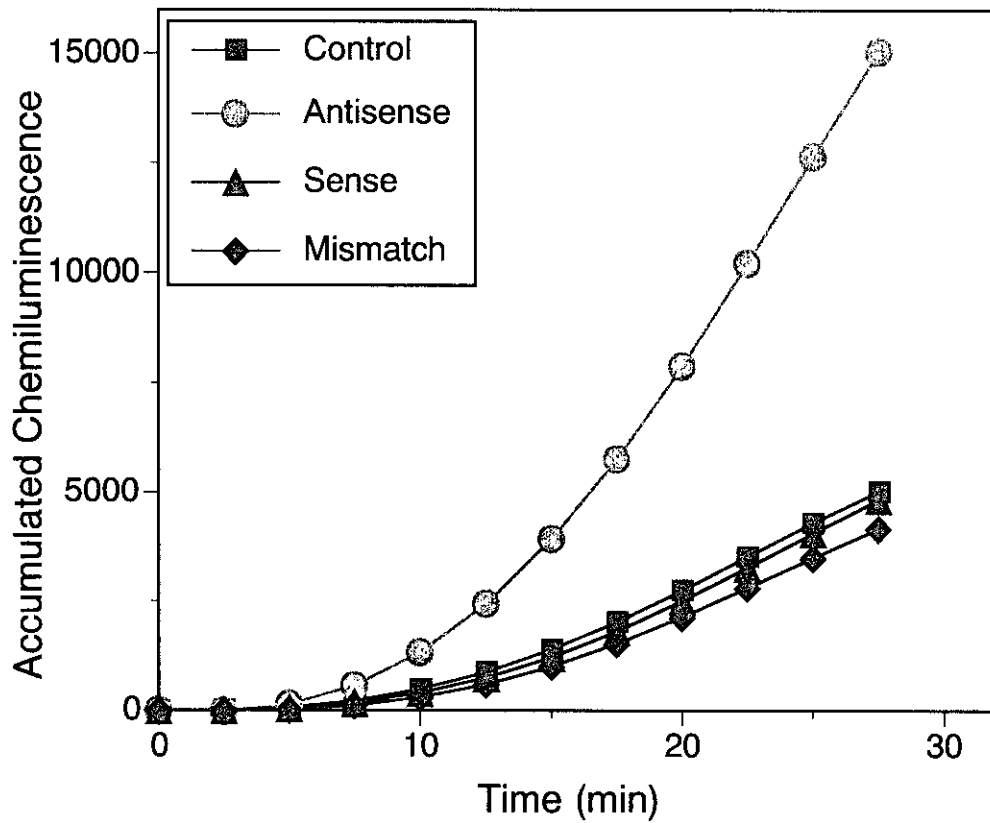


図1 活性酸素産生に対するコフィリンアンチセンスの効果

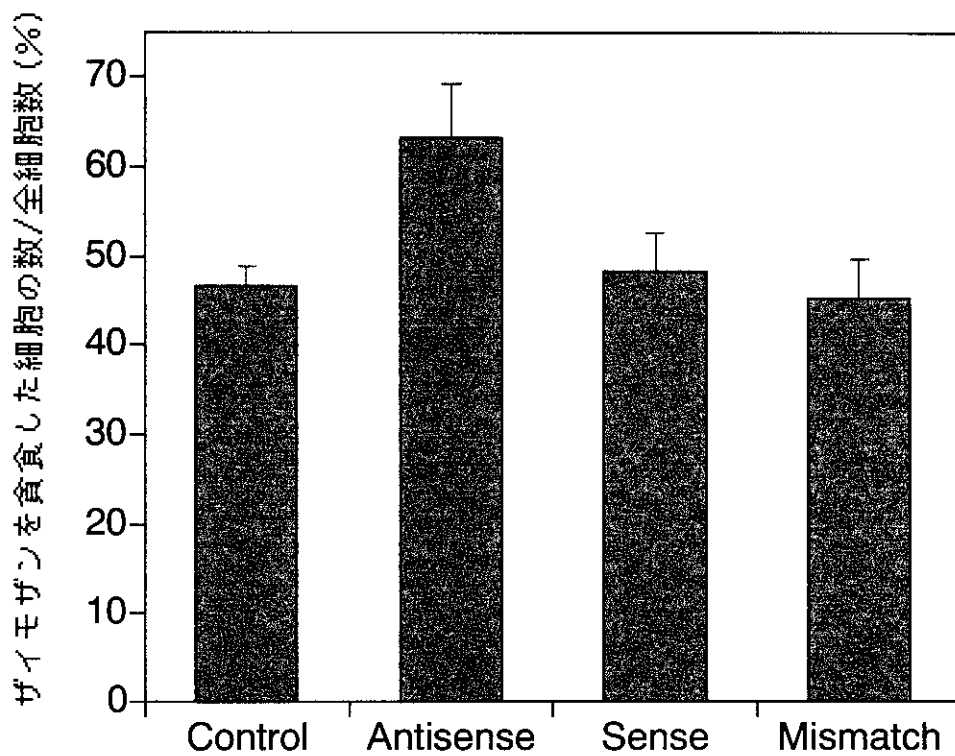


図2 食食に対するコフィリンアンチセンスの効果

を示さなくなる。一方、アンチセンス処理を行うと、コフィリンのタンパク量は減少する。つまり、コフィリンのリン酸化とアンチセンス処理は、細胞内でのコフィリン活性を低下させるという意味では同一方向に作用する。J.774.1細胞においては、オプソニン化ゼイモザン刺激によって、コフィリンはリン酸化され不活性型となり、F-アクチンが増加する。一方細胞応答として活性酸素の産生や食食反応が起きる。蛍光標識したファロイジンでF-アクチンを染色した実験の結果から、コフィリンアンチセンス処理によりコフィリン量が低下すると、細胞内でのF-アクチンが増加することが確認されたので、このF-アクチンの増加が活性酸素産生や食食反応の増大につながるものと考えられる。活性酸素産生酵素NADPH oxidaseは細胞膜及び細胞質に存在する複数の要素が細胞膜上で複合体を形成して活性型となるが、これらの要素がアクチン骨格あるいはアクチン結合タンパク質に結合していることや、酵素複合体が細胞骨格系と相互作用していることが報告されており、F-アクチンは何らかの形で活性酸素産生をサポートしていると思われる。また、最近筆者らは、コフィリンのリン酸化酵素LIMキナーゼに関して、野生型のLIMキナーゼを発現させた細胞では、リン酸化されたコフィリンの割合が増大して細胞内F-アクチン量が増加し、白血球機能は亢進する、逆にdominant negative型を発現させた細胞では、脱リン酸化されたコフィリンが増大してF-アクチン量が減少し、細胞機能は低下するという結果を得ている。この結果もF-アクチンと食細胞機能との深い関連を示している。従って、コフィリンアンチセンスによるF-アクチンの増加が、活性酸素産生の促進につながり、また、細胞のダイナミックな運動を伴う食食反応も増大させたものと考えられる。

## 5. まとめ

白血球機能制御を目的とするアンチセンスオリゴDNAに関して、細胞骨格系からのアプローチとして、F-アクチン調節因子であるコフィリンのアンチセンスオリゴDNAを作成した。また、白血球機能の中の活性酸素産生及び食食反応についてアッセイ系を構築した。このアッセイ系を用いてコフィリンアンチセンスの効果を検討したところ、コフィリン量の低下により活性酸素産生、食食反応とも増大することが示された。個々の機能を担うそれぞれの因子に対するアンチセンスオリゴDNA処理により白血球機能を低下させることは比較的容易にできると思われるが、反対に白血球機能を亢進させた場合には、コフィリンアンチセンスは有用なツールになるものと考えられる。

## 6. 研究発表

Matsui, S., Matsumoto, S., Adachi, R., Kusui, K., Hirayama, A., Watanabe, H., Ohashi, K., Mizuno, K., Yamaguchi, T., Kasahara, T. and Suzuki, K. LIM kinase 1 modulates opsonized zymosan-triggered activation of macrophage-like U937 cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 544-549 (2002).



---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業  
若手研究者奨励研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社